

Identifikasi *Rhabdovirus carpio* - Bagian 1: Metode kultur sel



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Peralatan	2
4 Bahan	2
5 Prosedur	2
6 Pembacaan hasil	3
Lampiran A (normatif) Pembuatan media dan pereaksi	4
Lampiran B (informatif) <i>Cytopathic effect</i> SVCV pada sel EPC dan EHM.....	6
Bibliografi	7
Gambar B.1 - <i>Cytopathic effect</i> SVCV.....	6



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang identifikasi *Rhabdovirus carpio* - Bagian 1: Metode kultur sel.

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis Perikanan Budidaya (SPT 65-05-S2) Perikanan Budidaya, melalui rapat konsensus pada tanggal 10 November 2011 di Riau, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian, perguruan tinggi, serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.19/Men/2010 tentang Pengendalian sistem jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Identifikasi *Rhabdovirus carpio* - Bagian 1: Metode kultur sel

1 Ruang lingkup

Standar ini menjelaskan identifikasi *Rhabdovirus carpio* dengan metode kultur sel.

2 Istilah dan definisi

2.1

carrier (pembawa)

suatu individu yang dalam tubuhnya mengandung organisme spesifik suatu penyakit tanpa menunjukkan gejala-gejala dan mampu membawa infeksi

2.2

cytophatic effect (CPE)

efek yang ditimbulkan berupa perubahan patologis dalam kultur sel

2.3

homogenat

cairan yang berasal dari hasil gerusan organ yang diencerkan dan dihomogenisasi

2.4

infeksi sistemik

tipe infeksi dari suatu penyakit yang menginfeksi seluruh tubuh

2.5

kultur sel

sel hewan yang ditumbuhkan secara *in vitro*

2.6

penyakit viral

penyakit yang disebabkan oleh virus

2.7

preparasi

proses pemisahan organ target dari tubuh ikan

2.8

Rhabdovirus carpio

merupakan jasad penyebab penyakit dari *spring viraemia of carp* (SVC)

2.9

***spring viraemia of carp* (SVC)**

penyakit ikan yang disebabkan oleh infeksi *spring viraemia of carp virus* (SVCV), termasuk dalam famili *Rhabdoviridae* dan secara sementara dimasukkan dalam genus *Vesiculovirus*, merupakan *single strand* (ss) RNA virus dengan polaritas negatif, yang dapat menyebabkan infeksi sistemik

3 Peralatan

- a) *autoclave*;
- b) alat sterilisasi;
- c) *biological safety cabinet* kelas IIA;
- d) botol *flask* kultur ukuran 25 ml atau 75 ml;
- e) botol media;
- f) erlenmeyer 100 ml;
- g) inkubator CO₂;
- h) *inverted* mikroskop;
- i) mikropipet 20 µl - 200 µl dan 100 µl – 1 000 µl;
- j) mortar dan *pestle*;
- k) papan autopsi, *disecting* set;
- l) *plate multiwell* 24;
- m) pH meter;
- n) sentrifus (minimal 3 000 rpm);

CATATAN point g) menggunakan inkubator biasa apabila media mengandung karbonat.

4 Bahan

- a) alkohol 70 %;
- b) antibiotik *penicillin-streptomycin* (Penstrep);
- c) *Eagle's minimum essential medium* (Eagle-MEM);
- d) *Fetal bovine serum* (FBS);
- e) L-*glutamin*; *mycostatin*;
- f) N-2-*hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid* (HEPES);
- g) organ target (ginjal, insang);
- h) *Phosphate bufer saline* (PBS);
- i) Sel *monolayer fathead minnow* (FHM) atau *epithelioma papulosum cyprini* (EPC);
- j) *Sodium bicarbonate* (NaHCO₃);
- k) *Tris buffer*;
- l) *Tween* 80;
- m) mikrotip 200 µl dan 1000 µl;
- n) mikrotube 1500 µl;
- o) filter 0,45 µm dan 0,22 µm;
- p) *syringe (spuit)* ukuran 2,5 ml sampai dengan 5 ml.

CATATAN Pembuatan media dan pereaksi diuraikan dalam Lampiran A.

5 Prosedur

5.1 Inokulasi contoh pada sel *monolayer*

- a) bersihkan permukaan tubuh ikan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol 70 %.
- b) bedah ikan menggunakan peralatan bedah steril, ambil organ target (ginjal, insang).
- c) buat suspensi 10 % dari organ target (1 bagian organ target ditambah 9 bagian PBS digerus dalam keadaan dingin menggunakan mortar).
- d) sentrifugasi suspensi dengan kecepatan 3 000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C lalu ambil supernatannya.
- e) encerkan supernatan 10 kali.
- f) saring supernatan dengan filter yang memiliki *pore size* 0,45 µm dan 0,22 µm.

- g) tambahkan antibiotik pada filtrat dengan dosis 1 000 iu/ml.
- h) inkubasikan pada suhu 20 °C - 22 °C selama 30 menit - 60 menit.
- i) teteskan filtrat ke botol (*flask kultur sel*) yang berisi *monolayer* sel FHM atau EPC dengan dosis 20 µl per cm² sel *monolayer*.
- j) inkubasikan pada suhu 20 °C - 22 °C.
- k) apabila diinkubasi menggunakan inkubator biasa, tambahkan larutan 7,5 % NaHCO₃ pada media untuk mempertahankan pH medium kultur 7,3 – 7,6.

5.2 Pengamatan CPE

- a) amati perkembangan CPE (mikroskop perbesaran 40x - 100x) setiap hari selama 10 hari.
- b) pertahankan pH dari media kultur tersebut antara 7,3 - 7,6 selama inkubasi pada suhu 20 °C, dengan menambahkan larutan *bicarbonat* (NaHCO₃) 7,5 % ke dalam medium (untuk kultur sel yang ditumbuhkan dalam botol yang tertutup rapat atau dalam botol yang tidak tertutup rapat pada inkubator CO₂, atau 2 M *Tris bufer* atau 25 mM medium yang di-*bufer* dengan HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid)).

5.3 Subkultivasi

- a) panen medium dari kultur sel yang diinokulasi.
- b) inokulasi kultur sel yang baru sesuai dengan 6.1.
- c) inkubasi dan amati seperti pada 6.2.

6 Pembacaan hasil

6.1 Inokulasi contoh pada sel *monolayer*

- segera lakukan identifikasi bila muncul CPE pada kultur yang diinokulasi dengan suspensi organ yang diuji: sel membulat dan terjadi lisis fokal.
- lakukan subkultur selama 7 hari, bila tidak terjadi CPE pada kultur sel yang diinokulasi (sedangkan pada kontrol virus ada terbentuk CPE).
- ulangi proses uji dengan sel yang masih baru (segar), bila kultur yang diinokulasi dengan kontrol virus tidak membentuk CPE.

6.2 Subkultivasi (subkultur)

Lakukan subkultur yang ke dua bila subkultur yang pertama masih negatif.

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan media dan pereaksi

A.1 Phosphate buffer saline (PBS)

Bahan:

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Akuades	800 ml

Cara membuat:

- larutkan semua bahan diatas ke dalam 800 ml akuades
- aduk hingga semua bahan larut.
- kemudian sesuaikan pH 7,2.
- tambahkan akuades sampai 1 000 ml.
- sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

A.2 Media Kultur *fathead minnow* (FHM) atau *epithelioma papulosum cyprini* (EPC)

Cara membuat:

- larutkan 0.3 g L-Glutamin *powder* dalam 10 ml akuades untuk membuat larutan 3 % L-Glutamin.
- larutkan 7,5 g NaHCO₃ dalam 100 ml akuades untuk membuat larutan 7,5% NaHCO₃.
- campurkan 487,5 ml akuades, 4,7 g MEM bubuk, 7,5 ml 7,5 % NaHCO₃, 5 ml 3 % L-Glutamin, dan 25 ml FBS.
- aduk hingga semua bahan terlarut.
- Masukkan ke dalam botol.
- sterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.3 Buffer 10 X Tris (0.5 M)

Cara membuat:

- masukkan 800 ml akuades ke dalam *beaker glass*, tambahkan Tris *base* 60,55 g dan 90 g *sodium chloride*.
- tambahkan 30 ml *hydrochloric acid* 37 % untuk mendapatkan pH 7,8.
- kemudian ditambahkan akuades hingga mencapai volume 1 l.
- saat akan digunakan encerkan 10 x.

A.4 Bufer Proteinase K

Cara membuat:

- larutkan 7,455 g KCl dalam 100 ml akuades untuk membuat larutan 1 M KCl.

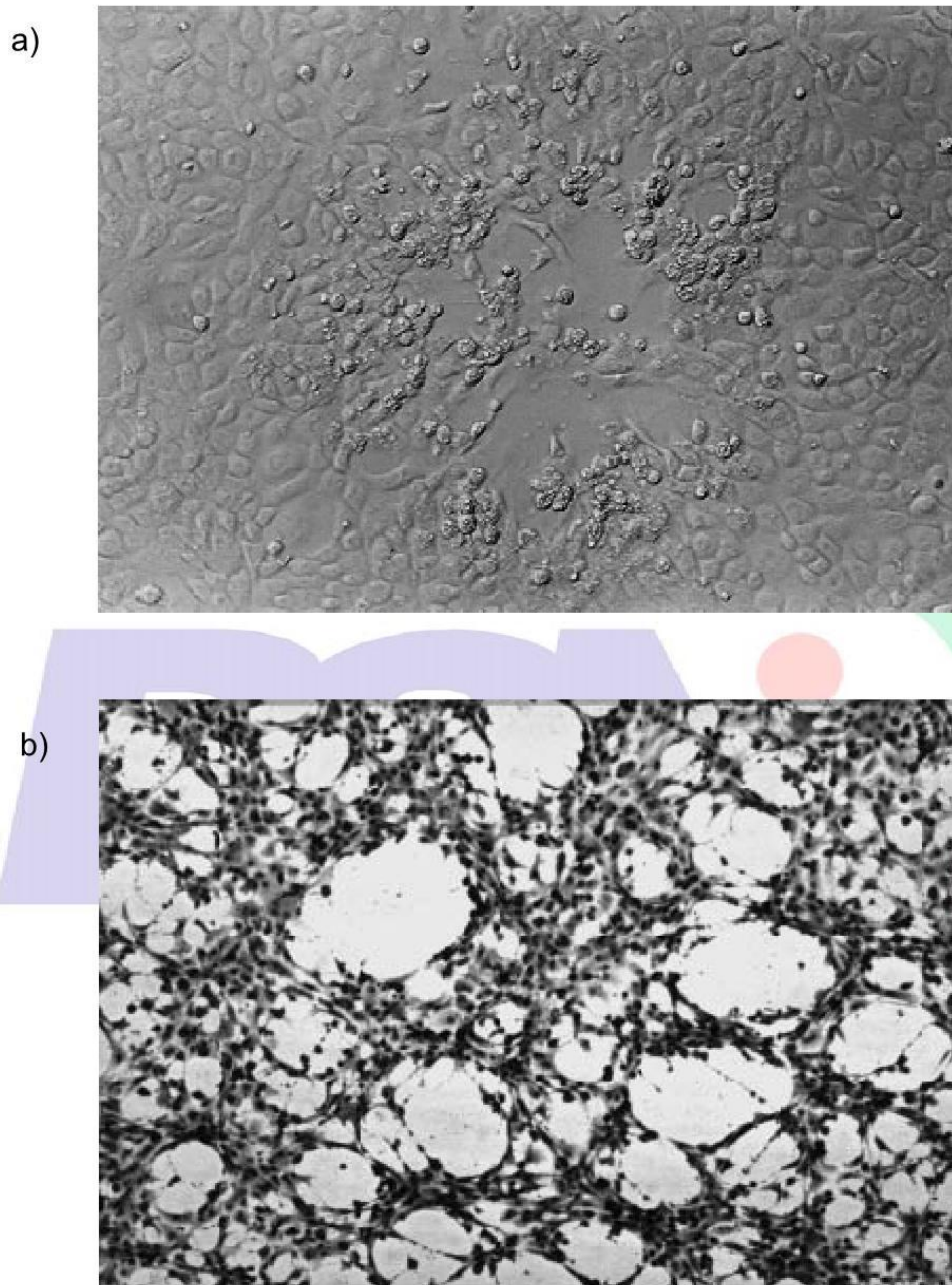
- b) larutkan 6,05 g Tris *base* dalam 100 ml akuades, tambahkan 21 ml *hydrochloric acid* 37 % dan sesuaikan pH 8,3 untuk membuat larutan 0,5 M Tris-HCl pH 8,3.
- c) campurkan 91,5 ml akuades, 5 ml 1 M KCl, 3 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,3, dan 0,5 ml Nonidet P-40.
- d) tambahkan 0,5 mg *proteinase* K untuk setiap ml campuran di atas, sehingga bufer mempunyai kadar akhir 50 mM KCl, 15 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,5 % *Nonidet* P-40 dan 0,5 mg/ml *proteinase* K.

A.5 1 M HEPES -NaOH pH 7.5

- a) larutkan 238 g HEPES ke dalam 700 ml akuades.
- b) tambahkan 5,5 g sodium hydroxide (NaOH) pelet dan sesuaikan pH 7,5.
- c) tambahkan akuades hingga 1 L.
- d) sterilkan dengan cara filtrasi menggunakan filter yang memiliki *pore size* 0,45 μm .



Lampiran B
(informatif)
Cytopathic effect SVCV pada sel EPC dan EHM



Keterangan:

- (a) *Cytopathic effect SVCV* pada sel EPC (perbesaran 230x) (Sano *et al.* in Woo & Bruno, 2011).
- (b) *Cytopathic effect SVCV* pada sel FHM (perbesaran 206x): sel membulat dan terjadi lisis fokal (Ahne *et al.*, 2002).

Gambar B.1 - *Cytopathic effect SVCV*

Bibliografi

Ahne, W., Bjorklund, H.V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. & Winton, J.R. 2002. *Spring viremia of carp (SVC)*. *Dis. aquat. Org.* 52: 261–272.

OIE, 2011. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal*. Office des International des Epizooties (OIE).

Sano, M., Nakai, T. & Fijan, N. 2011. *Viral Diseases and Agents of Warmwater Fish*. In: Woo P.T.K. & Bruno D.W. (eds). *Fish Diseases and Disorders Vol. 3: Viral, bacterial and fungal infections*. 2nd ed. CAB International, UK. 166–244.

